



Facultad de Veterinaria  
Universidad Zaragoza



# Trabajo de Fin de Grado en Veterinaria

Evolución clínica en animales infectados con Scrapie atípico

Clinical course in animals infected with atypical Scrapie

## **AUTORA**

Tamara Sánchez Reyes

## **DIRECTORAS**

María Belén Marín González

Alicia Otero García

Facultad de Veterinaria

2021

---

## ÍNDICE

<b>1. Resumen</b>	1
<b>2. Introducción</b>	3
2.1. Scrapie atípico	4
2.2. Identificación del agente causal	5
2.3. Genotipo	6
2.4. Patogenia y transmisión	7
2.5. Signos clínicos del scrapie atípico	9
2.6. Diagnóstico	9
2.7. Epidemiología	12
2.8. Plan de vigilancia	13
2.9. Nuevos descubrimientos	14
<b>3. Justificación y objetivos</b>	16
<b>4. Metodología</b>	17
4.1. Estudio bibliográfico	17
4.2. Estudio experimental	17
4.3. Elección de los animales	18
4.4. Inoculación	18
4.5. Evolución clínica	18
4.6. Necropsia de las ovejas	19
4.7. Técnica laboratorial	19
a) Técnica histológica	20
b) Técnica inmunohistoquímica	20
<b>5. Resultados y discusión</b>	21
5.1. Estudio de la evolución clínica	21
5.2. Estudio histopatológico	24
5.3. Diferencias IHQ entre Scrapie clásico y Scrapie atípico	26
<b>6. Conclusiones</b>	28
<b>7. Valoración personal</b>	30
<b>8. Bibliografía</b>	31
<b>9. Anexos</b>	35

## 1. RESUMEN

En 1732, en el continente europeo, se describe por primera vez una enfermedad que presentan de forma natural los pequeños rumiantes (especie ovina y caprina), caracterizada por la manifestación de una serie de signos clínicos propios de una degeneración a nivel de sistema nervioso central. En la mayor parte de los casos se podía observar un temblor intenso, chasquido de labios, alteraciones en la marcha, convulsiones y un prurito incontrolable que hacía a los animales frotarse de manera compulsiva contra árboles o rocas y esto derivaba en una caída de lana.

Así nacería el Scrapie clásico ovino, tembladera o prurigo lumbar, convirtiéndose en la primera encefalopatía espongiiforme transmisible (EET) descrita hasta entonces, la cual pasaría a formar parte de un conjunto de enfermedades neurodegenerativas progresivas y letales, causadas por unos agentes proteicos que, más tarde, serían conocidos como priones (Prusiner, 1982).

En 1998, en Noruega, mediante programas de vigilancia activa en ovejas muertas sin aparente enfermedad, se llega al diagnóstico de una variante del Scrapie, la Nor98, hasta ese momento desconocida, cuyas características clínicas, inmunoquímicas, patológicas y estructurales diferían de la enfermedad clásica. Es entonces cuando se hace una diferenciación entre dos cepas, Scrapie clásico y Scrapie atípico (Benestad et al., 2003).

Los animales afectados con Scrapie atípico presentan fundamentalmente ataxia y, en ocasiones, pérdida de condición corporal, pero es común que, a lo largo de la enfermedad, haya animales que no expresen sintomatología clínica evidente y mueran de forma repentina.

Una de las características más importantes de esta cepa atípica es que estaría asociada a animales genóticamente resistentes al Scrapie clásico y que, en la mayoría de los casos, se sospecha de una aparición repentina en alguna oveja sana del rebaño, ya que no hay datos concluyentes que indiquen cuál es la vía de transmisión de esta enfermedad.

A lo largo de este trabajo se profundizará en el estudio de la cepa Nor98, mediante una recopilación bibliográfica y un estudio *ante mortem* y *post mortem* en ovejas inoculadas con la cepa de Scrapie atípico, llevado a cabo por el Centro de Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes de la Universidad de Zaragoza, que muestre la etiología, inmunidad, patogenia, cuadro clínico, diagnóstico y plan preventivo conocido hasta ahora y aporte un poco más de claridad a la hora de diferenciar el conocido Scrapie clásico del Scrapie atípico.

## ABSTRACT

In 1732, a disease naturally occurring in small ruminants (sheep and goats) was described for the first time on the European continent. This disease was, characterised by the manifestation of several clinical signs typical central nervous system degeneration. In most cases, intense trembling, lip smacking, gait disturbances, convulsions and uncontrollable itching could be observed, causing the animals to rub compulsively against trees or rocks, resulting in wool shedding.

Classical ovine Scrapie was, therefore, born becoming the first described transmissible spongiform encephalopathy (TSE). Eventually, Scrapie became part of a group of progressive and lethal neurodegenerative diseases caused by protein agents that would later be known as prions (Prusiner., 1982).

In 1998, in Norway, through active surveillance programs in dead sheep without apparent disease, a previously unknown Scrapie variant was detected. This variant, Nor98, showed clinical, immunochemical, pathological and structural characteristics different from those of the previously known disease. A differentiation is then made between two strains, classical Scrapie and atypical Scrapie (Benestad et al., 2003).

Animals affected with atypical Scrapie show mainly ataxia and sometimes loss of body condition, but it is common that during the disease some animals do not show obvious clinical symptoms and die suddenly.

Among the most important characteristics of this atypical strain is that it is associated with animals genetically resistant to classical Scrapie and that it is believed to appear spontaneously in, healthy sheep from the Flock, since there is no conclusive data to indicate the transmission route of this disease.

Throughout this work we will study the Nor98 strain by means of a bibliographic revision and ante mortem and postmortem studies in sheep inoculated with the atypical Scrapie strain in the Centre for Encephalopathies and Emerging Transmissible Diseases of the University of Zaragoza. This study shows the aetiology, immunity, pathogenesis, clinical picture, diagnosis and preventive plan known up to now and provides a little more clarity when differentiating the known classical Scrapie from the atypical Scrapie.

## 2. INTRODUCCIÓN

Las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EET) están formadas por un conjunto de enfermedades neurodegenerativas, de carácter progresivo y letal, que afectan al sistema nervioso central debido a la acción de un agente proteico conocido como prion (Prusiner, 1982).

Estas enfermedades afectan tanto a animales como a humanos y se caracterizan por una afección de tipo espongiforme, con aparición de vacuolas a nivel de pericarion neuronal, provocada por la acumulación de este agente anómalo en el organismo, el cual no es otro que una proteína conocida como proteína priónica resistente (PrP<sup>Sc</sup>), cuya importancia reside en que presenta una estructura química similar a la de una proteína propia del tejido nervioso, llamada proteína priónica celular (PrP<sup>C</sup>) pero con la diferencia de que ambas presentan una configuración espacial distinta, lo cual hace que desencadene la enfermedad.

Entre las EET animales conocidas hasta el momento, además del scrapie, se encuentran la encefalopatía espongiforme transmisible del visón, encefalopatía espongiforme felina, la encefalopatía caquetizante crónica de ciervos y alces o la encefalopatía espongiforme bovina (EEB). Esta última es la más conocida y la que más trascendencia ha tenido, debido a la gran alarma a nivel sanitario y social creada en los años 80, debido a su transmisión a la especie humana (Bruce et al., 1997).

Pero, si bien es cierto que la EEB es la enfermedad más conocida de su grupo, la enfermedad prototipo y la que dio comienzo a esta serie de EET no fue otra que el Scrapie (Encefalopatía espongiforme ovina y caprina), también conocido como tembladera o prurigo lumbar, a través de la cual se llegó a identificar una base genética que pudiera explicar el desarrollo y la susceptibilidad de una EET.

Es a partir de los últimos estudios realizados sobre el scrapie y su base genética cuando han cobrado interés la llegada de nuevas teorías sobre el origen y transmisión de la enfermedad, adquiriendo mayor importancia nuevas variantes de la cepa clásica, siendo éste el caso del Scrapie atípico, cuyos estudios han demostrado ser un posible desencadenante de la EEB (Huor et al., 2019).

## 2.1. Scrapie atípico

A principios de los años 60 un estudio realizado por Pattison y Millson en 1961 (Pattison and Millson, 1961), reveló que, en el aislamiento de scrapie en la especie caprina se identificaron dos síndromes clínicos perfectamente diferenciados, los cuales se denominaron drowsy (somnoliento) y scratching (rascado vigoroso). Es entonces cuando se introduce el concepto cepa dentro de las encefalopatías espongiformes transmisibles.

Debido a la necesidad de comprender el comportamiento y la caracterización de estas cepas en las EET, a principios de los años 70 se llevaron a cabo estudios retrospectivos, en animales inoculados experimentalmente, en los cuales se valoraban diferentes parámetros entre los que se encontraban, periodos de incubación, clínica, lesiones histopatológicas y localizaciones en las que se observaban los depósitos de la proteína prion.

Estos estudios revelaron que, en función de la cepa causante de la enfermedad, se producían cambios patológicos diferentes, pero no era la única causante de estos cambios ya que, la especie y raza de los animales inoculados, jugaban un papel principal a la hora de manifestar una determinada clínica.

A partir de entonces, el concepto cepa adquirió una relevancia que ha ido incrementándose con el paso del tiempo, tanto es así que, actualmente, es una de las líneas principales de estudio en este grupo de enfermedades.

En 1998, en Noruega se describió por primera vez un caso de Scrapie que difería en cuanto a características clínicas, inmunoquímicas, estructurales y patológicas con respecto a la enfermedad clásica descrita hasta el momento, el cual sería asignado a una cepa atípica de la enfermedad cuyo lugar y año de descubrimiento le dio nombre, la Nor98, la cual sería la responsable de la aparición de una nueva enfermedad dentro de la gran familia que componen las EET, el Scrapie atípico (Benestad et al., 2003).

El Scrapie atípico es una de las muchas enfermedades incluida dentro del grupo de las EET que, al igual que ocurre con el clásico, afecta a pequeños rumiantes, tanto especie ovina como caprina. Se trata de una enfermedad neurodegenerativa progresiva y letal cuya causa no es otra de la acumulación de proteína priónica en el sistema nervioso central, debido a la conversión de la proteína del prion fisiológica (PrP<sup>C</sup>) en la isoforma patógena y mal plegada (PrP<sup>Sc</sup>), lo cual va haciendo que la enfermedad progrese a medida que esa proteína se va depositando en el individuo. Una de las características más notables de esta EET, a diferencia del resto, es que está

considerada como una enfermedad no contagiosa, la cual se manifiesta mayoritariamente en animales viejos, con una media de unos 6 años y que tiene un origen esporádico, apareciendo en animales aislados en rebaños.

Desde el primer informe de Nor98 en 2003 el Scrapie atípico ha sido identificado en ovejas y cabras de más de 20 países del mundo, entre ellos: Alemania, Bélgica, Dinamarca, Estonia, Francia, Irlanda, Islandia, Italia, Lituania, Portugal, Países Bajos, Reino Unido, Suecia, Suiza y Estados Unidos (Loiacono et al., 2009).

## **2.2. Identificación del agente causal**

El agente común causante de todas las EET, la PrP<sup>Sc</sup> o prion fue descrito en 1982 por Prusiner, aunque ya en 1967 un artículo publicado en la revista Nature, escrito por Griffith, ya lanzaría la primera hipótesis de que el agente causal era “solo una proteína” (Griffith, 1967). El estudio de Prusiner enunciaba que, estas enfermedades transmisibles, se producían por la acumulación de unas proteínas celulares que, postraduccionalmente, se verían modificadas. Esta modificación implicaba en la proteína priónica celular normal (PrP<sup>C</sup>), con una estructura rica en hélice alfa, un cambio de conformación, haciendo que el contenido cambiase a una estructura rica en hoja plegada beta y por tanto se convirtiese en la isoforma anormal (PrP<sup>Sc</sup>), aunque ambas proteínas presentaran la misma secuencia de aminoácidos.

Posteriormente, numerosos estudios parecen haber demostrado que, en esta proteína, la estructura primaria puede adoptar dos conformaciones diferentes, así como que este cambio sería postraduccionales, es decir, este hecho ocurriría después de que la PrP<sup>C</sup> haya alcanzado su posición normal en el dominio extracelular de las membranas neuronales o, incluso, durante el transporte vesicular de la proteína al interior de la neurona, lo que llevaría a las diferencias tan notables en cuanto a su estructura, propiedades y funciones.

Algunas de las diferencias que identifican a esta isoforma anómala serían: resistencia a la radiación ultravioleta e ionizante, resistencia a altas temperaturas y resistencia a tratamientos con formaldehído y que solo es parcialmente digerida por proteasas. Todas estas propiedades son una muestra más de que estos agentes son incompatibles con la presencia de ácidos nucleicos en su estructura y, por lo tanto, carentes de material genético.

En cuanto a su propagación en el organismo afectado, actualmente se sabe que PrP<sup>Sc</sup> actúa modificando la conformación entre las moléculas de PrP<sup>C</sup>, mediante una reacción autocatalítica, haciendo que todas las proteínas quedan con la misma conformación que PrP<sup>Sc</sup>.

### 2.3. Genotipo

Durante los años 50, Gordon et al realizaron uno de los primeros estudios destinados a conocer la relación que existía entre la infección con Scrapie y la base genética del hospedador en el cual, a través de la inoculación del mismo agente a 24 razas diferentes, se llegó a la conclusión de que existía una variación muy amplia en cuanto a la susceptibilidad en las distintas razas, así como en su periodo de incubación (Gordon, 1966).

Otra revelación que evidenciaría la existencia de factores genéticos en el hospedador que determinarían la susceptibilidad a la enfermedad llegaría en 1961 de mano de la Unidad de Neuropatología de Edimburgo. El estudio llevado a cabo reveló que, a través de la inoculación por vía subcutánea del agente tanto en la raza Cheviot como en la Herdwick, dentro de una misma raza existía una línea resistente, que no presentaba signos clínicos, y otra línea sensible (Kimberlin, 1978).

Posteriormente en 1979, Kimberlin realizó una revisión de los conocimientos que existían hasta el momento de la enfermedad Scrapie ovino, en la cual se lanzaron dos conceptos fundamentales: en primer lugar, expuso que, quizás, los animales que eran llamados “resistentes” posiblemente lo eran a la enfermedad, pero no a la infección, es decir, presentarían un periodo de incubación mayor pero su capacidad infectiva estaba presente. Por otro lado, y el más importante hasta la fecha, fue que existía la posibilidad de que los animales eran resistentes a la única cepa utilizada hasta el momento, pero que no lo fueran a otras cepas de scrapie que no se conocían.

El descubrimiento del gen *prnp*, el cual es el encargado de codificar la proteína PrP<sup>C</sup>, fue esencial ya que, desde ese momento, los estudios llevados a cabo se centraron en determinar si los diferentes polimorfismos que presentaba este gen podían ser los responsables de la presencia o ausencia de la enfermedad. Fue a partir de entonces cuando, tras numerosos estudios, se comprobó la existencia de unos polimorfismos en los codones 136, 154 y 171, los cuales están íntimamente asociados a la susceptibilidad o resistencia de la enfermedad.

Estudios posteriores llevados a cabo en 1995 establecieron 5 variantes haplotípicas presentes en el gen de la proteína prion ovina, que relacionan el nivel de susceptibilidad y la base genética del hospedador:

- Haplotipo VRQ, asociado a una alta incidencia de Scrapie clásico
- Haplotipo ARR, asociado a una baja incidencia de Scrapie clásico



- Haplotipos AHQ, ARQ, ARH, en cuyo caso, la susceptibilidad a la enfermedad estaría más relacionado con la raza.

En el caso concreto del de Scrapie atípico se sabe que la enfermedad aparece en animales genéticamente resistentes al Scrapie clásico, siendo el caso de los ARR homocigotos, que serían los menos susceptibles a presentar enfermedad clásica. Además, algunos estudios han demostrado que muy pocos animales que presentan el haplotipo VRQ, que sería el más susceptible en el caso de Scrapie clásico, finalmente contraen la cepa atípica. Sin embargo, hoy en día, poco se conoce con relación a los haplotipos más resistentes de la forma atípica y las posibles interacciones que se establecen con los de la forma clásica.

#### **2.4. Patogenia y transmisión**

El origen de la propagación de estas enfermedades, hasta el momento, se ha sugerido que sería a través de la ingesta de alimentos contaminados con el agente causal, así mismo, en el caso del Scrapie, otra vía de entrada del agente sería a través de la ingesta de la placenta contaminada o mediante pequeñas heridas que tenga el animal, aunque ésta última se encuentra en estudio.

La vía de llegada al SNC de los priones, que penetran al organismo por vía oral, se produce mediante la entrada del prion a través del tejido linfoide asociado al intestino, más concretamente a la altura del íleon, donde encontramos las placas de Peyer, formadas por este tipo de tejido. Desde esta posición el agente pasa a las células M, que son enterocitos modificados, las cuales tienen la función de captar a proteínas sin degradarlas y presentarlas como antígenos al sistema reticular. De esta manera la PrP<sup>Sc</sup> pasa al sistema linforreticular donde se acumula y posteriormente se replica (Mabbott and Bruce, 2001).

Tras permanecer en este lugar durante un tiempo, el agente se dirigiría al sistema nervioso central, bien por el sistema nervioso periférico, desde donde el agente puede diseminarse a diferentes órganos tales como glándulas adrenales, corazón, glándula mamaria, glándulas salivares, riñones, pulmón, hígado o páncreas, o bien mediante el sistema nervioso linforreticular (éste último sería el más importante en el caso del Scrapie), siendo el bazo el órgano más importante durante este proceso (Van Keulen et al., 2002). En el caso del Scrapie atípico es sabido que el sistema linforreticular no tiene un papel principal en la diseminación del agente por el sistema nervioso, por lo que algunos estudios exponen que una teoría sería una diseminación realizada solo por transporte axonal (Benestad et al., 2008; Monleón et al., 2011; Tranulis et al., 2011).

Así pues, los depósitos iniciales de PrP<sup>Sc</sup>, en el Scrapie clásico, se observan en los linfonodos asociados al íleon, desde donde se distribuye a lo largo de todo el sistema nervioso entérico. Desde aquí, a través del sistema parasimpático, la PrP<sup>Sc</sup> llega hasta el SNC, bien mediante la médula espinal, mediante el nervio esplácnico y los linfonodos mesentéricos craneal y celiaco. Desde aquí, los priones llegan a la médula oblongada, lugar donde podemos encontrar mayor depósito del agente en fases iniciales de la enfermedad a diferencia del caso de la forma atípica de Scrapie, donde la distribución del prion no se localiza en la médula oblongada, sino que el depósito mayoritario lo podemos encontrar a nivel del cerebelo (Benestad et al., 2003).

En referencia a las diferencias encontradas en el caso de la cepa Nor98, una de las teorías que cobran fuerza en relación a la neuroinvasión, y que no puede ser descartada, es que el agente llegue a través de la sangre hasta el encéfalo. Unos estudios publicados en 2002 describieron la transmisión del scrapie mediante transfusiones sanguíneas (Hunter et al., 2002), lo cual indica que la vía hematológica sería otra vía por la cual se disemina esta proteína, siendo una ruta alternativa de llegada al organismo. Asimismo, la vía linfática también ha sido descrita como ruta de diseminación ya que se han observado depósitos de PrP<sup>Sc</sup> en linfonodos (Andreoletti et al., 2011).

En la actualidad aún se desconocen cuáles son las rutas de transmisión de las EET y son varias las teorías que podrían explicar diferentes vías de transmisión de la enfermedad. En cuanto a la transmisión horizontal parece estar relacionada a la ingesta de alimentos contaminados o mediante el contacto directo, aunque en el caso del Scrapie atípico este hecho no está probado. Por otro lado, cuando se habla de transmisión vertical, en la enfermedad clásica, los altos niveles de PrP<sup>Sc</sup> en la placenta sugieren que el feto puede infectarse a través de su madre, aunque esto, según estudios recientes, no ocurriría en todos los casos ya que, en fetos que presentan un genotipo resistente al Scrapie clásico, no se observan depósitos del agente en sus placentas, por lo que no se presentarían la enfermedad (Andreoletti et al., 2002; Tuo et al., 2002; Alverson et al., 2006). Por otro lado, ovejas que presentan el genotipo ARR/VRQ tampoco presentan depósitos del agente en la placenta, aun presentando sus fetos alelos susceptibles, lo cual podría asociarse a la poca existencia de PrP<sup>Sc</sup> en el tejido linfático de estos animales y, en consecuencia, a una ineficaz diseminación de PrP<sup>Sc</sup> en la placenta (Lacroux et al., 2007).

En cuanto a la transmisión materna o paterna, se ha observado que la transmisión materna es mucho más importante que la paterna. En este punto también es muy importante destacar los tiempos de permanencia de los progenitores, reduciéndose el número de animales que

presentan la enfermedad a medida que se reduce el tiempo de exposición con la madre infectada.

### **2.5. Signos clínicos del scrapie atípico**

El Scrapie, tembladera o prurigo lumbar son términos comúnmente conocidos que describen los signos clínicos de esta EET, pero, a diferencia de lo que podemos ver en la enfermedad clásica, el diagnóstico del Scrapie atípico se ha dado de forma activa en animales que en apariencia estaban sanos y no solo en animales clínicamente sospechosos. Esto es así porque la clínica en estos animales es mucho menos evidente y, normalmente se da en animales viejos, por lo que muchas de las alteraciones pasan desapercibidas por los ganaderos.

Dentro de los estudios llevados a cabo para determinar los signos clínicos propios de esta enfermedad se ha determinado que la patología más destacada y generalizada en estos animales es la presencia de ataxia, la cual estaría presente en el 100% de los animales que presentan clínica, sin aparición de prurito o alteraciones en la lana (Konold et al., 2007). Otros signos que se pueden observar son cambios a nivel de comportamiento tales como nerviosismo o ansiedad, así como pérdida de la condición corporal y ausencia del reflejo de amenaza (Benestad et al., 2003; Konold et al., 2006; Onnasch et al., 2004; Vidal et al., 2007), aunque este dato se ha dado en algún caso aislado.

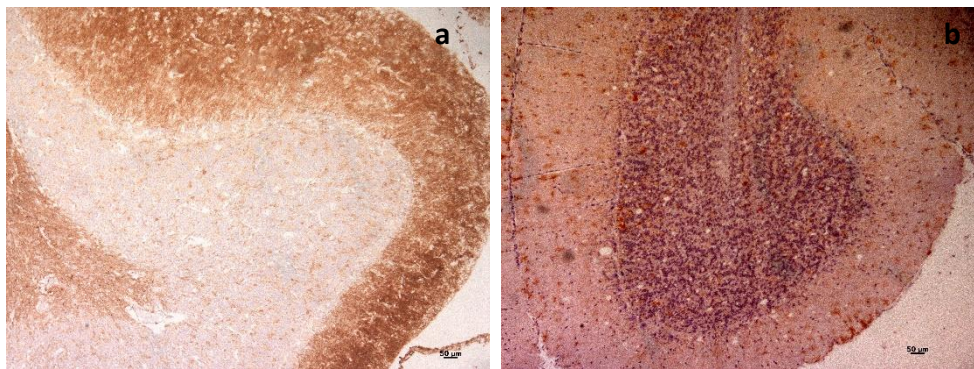
### **2.6. Diagnóstico**

Los estudios realizados a lo largo de los últimos años han revelado que el Scrapie atípico afecta principalmente a animales genéticamente resistente al Scrapie clásico (Saunders et al., 2006; De Bosschere et al., 2007). La detección de estos animales se realiza mayoritariamente a través de la vigilancia activa ya que, a diferencia de lo que ocurre en la enfermedad clásica, los signos clínicos que presentan los animales afectados no evidencian, en la mayoría de los casos, la enfermedad.

A nivel laboratorial, al igual que lo que ocurre en el diagnóstico clínico, las características histológicas varían notablemente con respecto a la enfermedad clásica ya que, a diferencia de las alteraciones que se pueden observar en los individuos afectados con esta enfermedad, como lo son hipertrofia e hiperplasia de los astrocitos, pérdida neuronal, formación de vacuolas a nivel de SNC y acumulación de proteína priónica (PrP<sup>Sc</sup>), en el Scrapie atípico apenas se evidencia vacuolización en el óxex o médula oblongada, así como depósitos de PrP<sup>Sc</sup> en esta zona, pero si se puede ver esta vacuolización y depósitos de agente priónico en el cerebelo y córtex cerebral

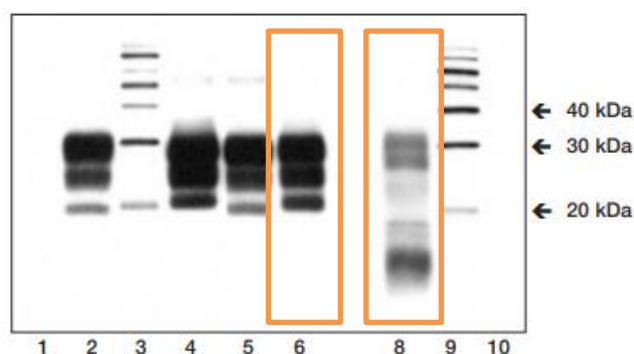
(Greenlee & Greenlee, 2015). Por otro lado, en la mayoría de los casos, tampoco se han encontrado acúmulos de PrP<sup>Sc</sup> fuera del SNC (Andreoletti et al., 2011).

En los casos de Nor98, al igual que en el Scrapie clásico y en otras EET, la principal técnica de diagnóstico para ver los depósitos de PrP<sup>Sc</sup> es la inmunohistoquímica (Figura 1). Con esta técnica, lo que se pretende es la identificación de los depósitos granulares de la PrP<sup>Sc</sup> en regiones como el núcleo espinal del cerebelo y el nervio trigémino mediante IHQ (Loiacono et al., 2009). Una diferencia notable que se observa en el Scrapie atípico con relación a la enfermedad clásica, es que no hay referencias sobre una tinción intraneuronal. Por otro lado, otra observación importante es que, tampoco se encuentra afectado el núcleo motor dorsal del nervio vago, siendo esta patología una estructura primaria afectada en el Scrapie clásico. Por último, a nivel del cerebelo, se observa una intensidad de la inmunotinción de PrP<sup>Sc</sup> muy superior a lo observado en la enfermedad clásica (Benestad et al., 2008).



**Fig. 1:** Técnica IHQ realizada a nivel de cerebelo ovino, dando como resultado un precipitado rojo, correspondiente a una muestra positiva a depósito de PrP<sup>Sc</sup> (10x); a) Positivo a Scrapie atípico; b) Positivo a Scrapie clásico.

Otro de los métodos diagnósticos que se utilizan para el diagnóstico del Scrapie atípico es el Western Blotting (Figura 2). En esta técnica, tras separar las proteínas mediante electroforesis y transferirlas a una superficie de membrana, se exponen a unos anticuerpos específicos contra la proteína de estudio, la cual es finalmente teñida por un fluoróforo. La muestra final emite una luz que se traduce en forma de bandas. Los resultados de estudios realizados a muestras de animales con la cepa nor98, al igual que pasaba con la IHQ, muestran una diferencia significativa con relación a la enfermedad clásica. Mientras que en Scrapie clásico aparecen 3 bandas de proteínas con un tamaño de 18 a 30 kD, en Scrapie atípico se pueden observar 3 bandas de proteínas con una banda no glicosilada con un tamaño de, aproximadamente, 12 kD.



**Fig. 2:** Imagen tomada de: OIE. 2018. *TeSeE™ Western Blot*. Folleto. Francia.

En la imagen se puede observar los patrones de bandas esperados para una muestra positiva a Scrapie clásico (posición 6) y una muestra positiva a Scrapie atípico (posición 8).

Con respecto al resto de métodos de diagnóstico utilizados habitualmente en otras enfermedades cabe mencionar que, en los dos tipos de scrapie, así como en el resto de EET, debido a la carencia de ácidos nucleicos del agente causal, no es posible basar el diagnóstico en métodos como PCR. Por otro lado, pruebas como la serología tampoco son aplicables ya que el organismo infectado no reconoce a la PrP<sup>Sc</sup> como un agente extraño, por lo tanto, no se produce una respuesta inmune específica.

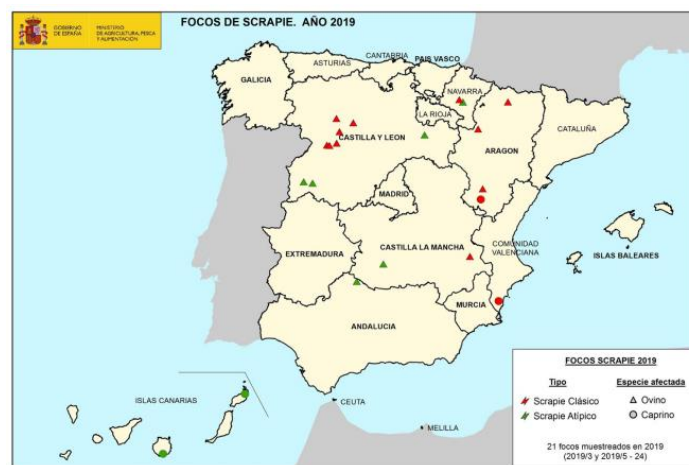
Por último, es importante destacar que en los métodos laborales de diagnóstico oficiales de las EET son realizados postmortem en muestras de tejido del sistema nervioso central, según la Organización Mundial de la Sanidad Animal (OIE, 2008), debido a la falta de una prueba fiable que se centre en la detección de la proteína en puntos específicos en el animal vivo.

## 2.7. Epidemiología

Los primeros datos epidemiológicos emitidos sobre el scrapie vinieron desde Reino Unido, desde donde se informaba que se trataba de una enfermedad endémica en el país y que, debido a la gran población existente de ganado ovino, la enfermedad experimentó una gran diseminación. A partir de aquí, a través del consumo de harina de carne y hueso de origen ovino, el agente saltó al ganado bovino, haciendo que la enfermedad finalmente se expandiera al resto de países debido al constante reciclado del agente priónico. A partir de este momento el salto entre especies favoreció la selección de distintas cepas, las cuales han ido adaptándose a su hospedador. Sin embargo, hoy en día, no es posible conocer la epidemiología y patogénesis de la enfermedad (Dawson et al, 1998) aunque numerosos autores exponen que la gran resistencia que presenta el prion, tanto a la inactivación como al medio ambiente constituyen uno de los factores epidemiológicos más importantes.

En España los primeros casos de scrapie clásico detectados no llegaron hasta 1984, los cuales fueron reportados desde Aragón (García de Jalón et al., 1987). Posteriormente llegaría la cepa atípica, aunque son pocos los datos ofrecidos acerca de esta enfermedad. Recientemente, gracias a la realización de test discriminatorios se está empezando a llevar a cabo un plan de vigilancia sobre el Scrapie atípico, aunque es imprescindible revisar los planes de genotipado ya que se sabe que es el factor principal a la hora de presentar la enfermedad.

La situación epidemiológica en España muestra que en el año 2019 fueron detectados 21 focos de scrapie de los cuales, 8 correspondían a la cepa Nor98. Con este dato, el número de focos totales contabilizados en el periodo de 2000-19 alcanzan los 556.



**Fig. 3:** Distribución a nivel nacional de los focos, tanto de Scrapie clásico como de atípico, predominantes en cada comunidad (Ministerio de agricultura, pesca y alimentación, 2019).

Desde la introducción de la vigilancia activa llevada a cabo desde 2002, los casos detectados han ido incrementándose progresivamente. Su distribución, como se observa en la imagen obtenida de MAPA (Ministerio de agricultura, pesca y alimentación), se reparte por todo el país, aunque el mayor número de focos se encuentran en las comunidades donde el número de animales de ganado ovino es mayor. Por otro lado, se observa un número al alza de casos detectados de Scrapie atípico (Figura 3)

En cuanto a la situación a nivel europeo, desde el año 2002, han sido detectados unos 600 focos de scrapie en ovino y unos 1000 focos en caprino, por lo que, a pesar de su detección y el plan de vigilancia y control que se da sobre la enfermedad, la tendencia de la presencia del scrapie en el resto de los países se mantiene constante, aunque hay algunas zonas, como Islandia o Noruega en los que la presencia de casos es casi testimonial. Lo que sí que parece que es un

hecho es que, la heterogeneidad de la implementación de actividades de vigilancia y control que existe entre países, hacen que los datos observados sean muy variables.

## **2.8. Plan de vigilancia**

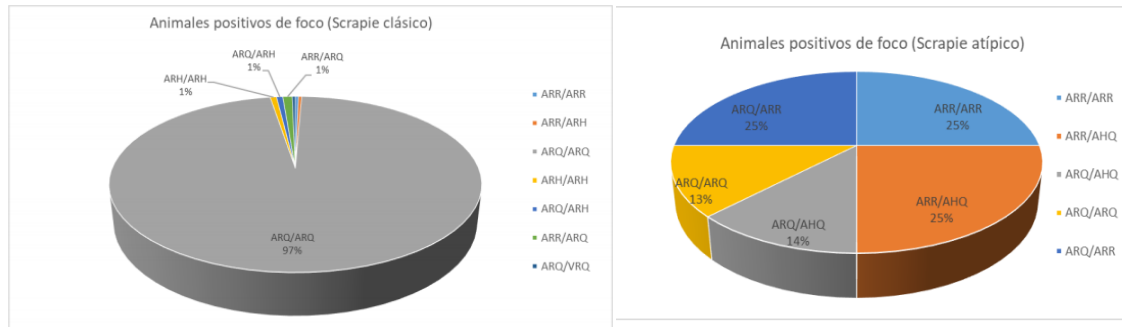
La identificación y la supresión de los factores de riesgo asociados a la propagación del scrapie clásico, atípico y, en general, de todas las EET, es la base del programa de vigilancia y control de estas enfermedades.

Estudios realizados hasta el momento no han evidenciado un riesgo real de que el scrapie represente un riesgo para la salud humana, sin embargo, la detección de casos naturales de EEB en pequeños rumiantes, más concretamente en cabras (Eloit et al., 2005; Jeffrey et al., 2006) demuestra que esta enfermedad puede aparecer y transmitirse al ser humano por lo que las principales medidas adoptadas para el control y vigilancia de la EEB han sido extrapoladas para ser aplicadas en scrapie y sus cepas.

Las medidas adoptadas se centran en 3 puntos:

- Prohibición del uso de las Harinas de carne y hueso (HCH). El reciclaje del agente causal en alimentación animal fue uno de los principales medios de transmisión y propagación de las EET, lo cual condujo a una prohibición que se inició en Reino Unido y posteriormente se extendió a la Unión Europea.
- Retirada de los MER de las canales de rumiantes. Se trata de la medida más importante en sanidad humana para evitar una posible transmisión a través de la cadena alimentaria.
- Implantación de un programa de vigilancia. El objetivo de esta implantación es la detección de animales infectados y su posterior eliminación. De igual modo, a través de la vigilancia, se puede conocer la prevalencia de la enfermedad, así como la efectividad de las medidas tomadas para su control. Este programa consta, por un lado, de una vigilancia pasiva, a través de la cual se declaran los casos clínicamente sospechosos y, por otro lado, de una vigilancia activa, que se basa en la realización de pruebas laboratoriales de muestras de animales elegidos al azar en explotaciones ganaderas y mataderos. Esta medida supone un avance en la detección de scrapie y sus variantes.

Por otro lado, otra medida que se encuentra dentro del programa de erradicación del Scrapie, y cuya finalidad es la erradicación de focos sensibles frente a la enfermedad es el genotipado. Mediante esta medida, durante el 2019 se muestrearon 88.655 genotipos, representando un mayor predominio los halotipos ARR y ARQ. En cuanto al genotipo más frecuente en el caso de animales en Programas de selección de resistencia frente a Scrapie es el ARR/ARR.



Gráficas obtenidas del Informe Epidemiológico final sobre las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles en España a lo largo del año 2019.

- **Fig. 4:** Genotipado animales positivos de foco (Scrapie clásico). Año 2019
- **Fig. 5:** Genotipado animales positivos de foco (Scrapie atípico). Año 2019

## 2.9. Nuevos descubrimientos

Una de las peores crisis alimentarias conocidas hasta el momento corresponde a la comúnmente conocida como “el mal de las vacas locas” o Encefalopatía espongiforme bovina, la cual se produjo a finales de los años 90. Como consecuencia, más de 200 personas contrajeron la variante de la enfermedad de Creutzfeld-Jacob, una encefalopatía neurodegenerativa mortal. El descubrimiento de esta nueva zoonosis supuso el sacrificio de millones de animales en todo el mundo.

Hasta ahora la hipótesis que se manejaba era que, debido al consumo de pienso elaborado con harinas de carne y hueso de ovejas contaminadas con scrapie clásico, el ganado bovino había adquirido la enfermedad pero, en 2019, un estudio llevado a cabo por investigadores, entre los que se encuentran Rosa Bolea y Juan José Badiola del Centro de Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes de la Universidad de Zaragoza ha revelado que el origen de la EEB efectivamente se da en el scrapie, pero no por la cepa clásica como se creía hasta ahora sino por la cepa Nor98, que da lugar al Scrapie atípico (Huor et al., 2019).

Esta nueva línea de investigación demuestra que la transmisión entre especies puede hacer que las propiedades patológicas y biológicas del agente cambien, haciendo que la proteína prion



ovina, que en principio no es transmisible, al entrar en contacto con proteína prion bovina se convierte en un agente zoonótico, lo cual implica que la exposición de ganado bovino a la cepa atípica de scrapie puede producir la emergencia de nuevos casos de EEB.

Este descubrimiento es clave en los planes de vigilancia y control de las EET y mejorará la evaluación de riesgo de estas enfermedades tanto en sanidad animal como en salud pública.

### 3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El Scrapie clásico ha sido estudiada, a lo largo de la historia, por numerosos autores en las diferentes especies animales, llegando a tener actualmente una amplia bibliografía que describe detalladamente tanto los aspectos clínicos como histopatológicos que presentan los animales infectados con esta enfermedad. Sin embargo, en el caso del Scrapie atípico, es mucho menos frecuente encontrar información variada y detallada acerca de las características y diferencias que describen a la cepa Nor98.

Tal y como se ha expuesto anteriormente, los estudios realizados acerca del Scrapie atípico han puesto de manifiesto que, la aparición de esta enfermedad, así como su transmisión, están relacionados con la diferencia genotípica que presentan, en este caso, las ovejas, y con su resistencia a presentar el Scrapie clásico. Por otro lado, a nivel histopatológico también se observan diferencias con respecto a la enfermedad clásica, principalmente en cuanto a la distribución de la PrP<sup>Sc</sup>, la cual se limita al SNC y se acumula principalmente en la zona del cerebelo.

Asimismo, las diferencias presentes entre ambas enfermedades también son descritas a nivel clínico, tanto así que, en numerosas ocasiones, la evidencia de infección en una oveja con scrapie atípico solo es descrita a nivel laboratorial, debido a la inapariencia clínica que manifiestan muchos de los animales afectados.

Por esto los objetivos que se pretenden alcanzar en el presente trabajo de fin de grado son los siguientes:

- Llevar a cabo un estudio sobre la evolución clínica que puede observarse en función de su genotipo y cómo de determinante es éste en cuanto a la evolución de la enfermedad.
- Establecer una comparativa entre el Scrapie clásico y el Scrapie atípico con el fin de aportar información acerca de las posibles diferencias observables entre ambas enfermedades tanto a nivel clínico como a nivel histopatológico.
- Aprender a medir las distintas alteraciones que se producen a nivel clínico a través de pruebas de campo rudimentarias desde una presentación temprana de la enfermedad.
- Adquirir conocimientos para poder diferenciar microscópicamente los distintos tipos de depósitos de PrP<sup>Sc</sup> así como observar la distribución de esos depósitos en los diferentes cortes del SNC y la diferencia existente con el Scrapie clásico.

## **4. METODOLOGÍA**

### **4.1. Estudio bibliográfico**

Una parte fundamental para poder realizar un estudio experimental sobre el Scrapie atípico ha sido la realización de una búsqueda exhaustiva y específica de material bibliográfico con el fin de exponer de manera técnica tanto las características que presenta la enfermedad en la especie ovina, así como las diferencias observadas, ya sea a nivel clínico como a nivel histopatológico, con respecto al Scrapie clásico. Para llevar a cabo esta revisión bibliográfica se han consultado diferentes publicaciones especializadas entre las que se encuentran, por una parte, libros especializados, tanto en Scrapie como en encefalopatías espongiformes transmisibles, así como publicaciones científicas como pueden ser revistas, informes científicos, tesis doctorales o abstracts de congresos, obtenidos de bases científicas como son PubMed o Science Direct. Se han utilizado para la búsqueda las siguientes palabras clave o combinación de palabras: Scrapie, Atypical Scrapie, Nor98, EET, sheep, prion, prionopathy, epidemiologic Nor98, diagnostic Nor98, Western Blotting (Scrapie/tembladera, scrapie atípico, Nor98, encefalopatías espongiformes transmisibles, oveja, prion, enfermedad priónica, epidemiología Nor98, diagnóstico Nor98, técnica Western Blotting). También se han consultado páginas oficiales como son el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación del gobierno de España (MAPA) o la Organización Mundial de la sanidad Animal (OIE). El modelo seguido para la indicación de las referencias bibliográficas ha sido el estilo Harvard, tal y como se establece en la guía para la realización del TFG (trabajo fin de grado) de la Universidad de Zaragoza.

### **4.2. Estudio experimental**

El presente trabajo de fin de grado se ha realizado a través de un análisis retrospectivo de seis ovejas de raza churra provenientes de Bescós de la Garcipollera (Huesca), las cuales fueron inoculadas con scrapie atípico posteriormente. El estudio experimental realizado sobre la inoculación, seguimiento y necropsias realizadas a las ovejas infectadas con la cepa Nor98, fue llevado a cabo por el grupo de investigación del centro de Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes de la Universidad de Zaragoza, en las instalaciones de nivel P3 de bioseguridad de dicho centro. Este estudio tuvo una duración de 6 años, iniciándose la primera inoculación, en la especie ovina, vía intracraneal en el año 2013.

### **4.3. Elección de los animales**

Para llevar a cabo este estudio se utilizaron seis ovejas hembra de raza churra comprendidas entre los 174 y 206 días de edad (5-7 meses) las cuales fueron divididas en dos grupos según su genotipo:

- AHQ/AHQ, relacionado a una alta susceptibilidad a desarrollar Scrapie atípico.
- ARR/AHQ, que expresa uno de los alelos que proporciona resistencia a la enfermedad clásica pero susceptible al Scrapie atípico.

Una vez llegadas al Centro de Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes, las ovejas fueron desparasitadas, vacunadas frente a la enterotoxemia y valoradas clínicamente.

Por último, se procedió a la inoculación del agente de forma intracraneal (IC), para lo cual se utilizó un homogeneizado preparado a partir de un encéfalo positivo a scrapie atípico.

### **4.4. Inoculación**

Para la realización de la inoculación se realizó una pequeña perforación a nivel del hueso craneal mediante la utilización de un taladro especial, concretamente en el seno frontal, a un centímetro y medio de la línea media. Una vez realizada la perforación se procedió a depositar el inóculo (0.5 mililitros a cada oveja) en la región frontal de la corteza cerebral con la ayuda de una aguja hipodérmica de 25G de diámetro. Durante todo el proceso los animales estaban bajo un plano anestésico profundo. Tras la realización de la intervención se les administró a las ovejas un tratamiento antibiótico.

Todos los procedimientos llevados a cabo fueron aprobados por la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza con el código PI 13/10. El manejo de los animales se realizó de acuerdo con la Política Española de Protección Animal recogida en el RD 53/2013, que cumple con la directiva de la Unión Europea 2010/63/UE relativa a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

### **4.5. Evolución clínica**

Desde el momento de la inoculación de las ovejas se llevaron a cabo diversas pruebas diagnósticas que permitieron establecer el momento en el que se iniciaron los primeros signos clínicos de la enfermedad. Entre las pruebas realizadas se encontraban: evaluación de la postura, presencia de posibles movimientos anormales, marcha y propiocepción, estado neurológico, presencia de lesiones en piel, condición corporal y estado de la lana. Dado que los

primeros signos clínicos que presentan las ovejas enfermas de scrapie atípico están relacionados con la coordinación y la propiocepción, una de las principales pruebas de elección fue la privación del sentido de la vista mediante el uso de un antifaz.

Para tener un registro a través del cual realizar un estudio sobre los signos clínicos que presentaban las ovejas y las circunstancias en las que los presentaban se llevaron a cabo filmaciones frecuentes de las ovejas inoculadas, en concreto de cinco de los animales ya que una de las ovejas falleció por causas ajenas a la enfermedad previamente a presentar clínica. Estas filmaciones se tomaron en diferentes periodos de tiempo para establecer la evolución clínica que presentaba la enfermedad en ambos grupos de animales inoculados con la cepa Nor98 y, posteriormente, establecer una comparativa con la clínica presente en animales afectados con la enfermedad clásica.

#### **4.6. Necropsia de las ovejas**

Una vez la enfermedad llegó a término se procedió al sacrificio de los animales mediante una inyección intravenosa de pentobarbital sódico (Dolethal®), tras lo cual se realizó una necropsia completa de los cinco animales. Durante la realización de la misma, se llevó a cabo la toma de las siguientes muestras:

- Tejido nervioso: Corteza cerebral frontal y occipital; hipocampo; óbex; puente; cerebelo; médula espinal (ME); nervio trigémino, quiasma óptico, nervios braquial y ciático.
- Tejido linforreticular: Tercer párpado; linfonodos submandibulares, retrofaríngeos, pre-escapulares, mediastínicos, mesentéricos, iliacos, mamarios y poplíteos; placas de Peyer de íleon y yeyuno; válvula ileocecal y bazo.
- Tejidos gastrointestinales: Lengua, esófago, rumen, retículo, omaso, abomaso, duodeno, yeyuno, íleon, colon y recto.
- Otros tejidos: piel, pulmón, corazón, hígado, riñón, glándula adrenal, útero, ovarios, glándula mamaria y vejiga urinaria.

Para realizar la conservación y posterior estudio se tomaron muestras por duplicado, una para su fijación en formol al 10% y la segunda para su congelación a -80°C.

#### **4.7. Técnica laboratorial**

El estudio microscópico fue realizado a partir de muestras previamente fijadas en formaldehído al 10% durante 48 horas y posteriormente incluidas en bloques de parafina. Con un micrótopo

se realizaron cortes de un grosor de alrededor de 4 micras de espesor y fueron montados en portaobjetos de vidrio para ser teñidos empleando diferentes técnicas.

En primer lugar, se llevó a cabo una tinción con hematoxilina-eosina con el fin de realizar un estudio de las lesiones histopatológicas presentes en las muestras.

Por otro lado, se empleó la técnica de Inmunohistoquímica (IHQ) para detectar la PrP<sup>Sc</sup>, para lo cual se utilizó el anticuerpo 8G8, formulado contra la proteína PrP recombinante humana, el cual ha sido probado en numerosos estudios como uno de los que mejor reconocen la proteína priónica en scrapie atípico (Andreoletti *et al.*, 2011). El método de realización de esta técnica fue el descrito por Monleón *et al.* (2003).

Las muestras objeto de estudio de cada una de las ovejas fueron: médula espinal cervical, óxex, cerebelo, puente del encéfalo, mesencéfalo, tálamo y ganglios basales (Anexo 2).

Para finalizar, se tomaron once fotografías correspondientes a las diferentes áreas del sistema nervioso ya mencionadas, utilizando diferentes aumentos, en función de la zona de estudio. Para ello se utilizó una cámara AxioCam MRC5 (Carl Zeiss Microimaging).

#### a) Técnica histológica

A través de esta técnica se valoró subjetivamente la vacuolización observada en los tejidos mediante una observación generalizada de las áreas, midiendo presencia de vacuolas en el tejido. Simultáneamente, tras la obtención de los resultados, se llevó a cabo el estudio histológico de unas muestras tomadas de ovejas afectadas con Scrapie clásico con el fin de observar las diferencias existentes entre ambos grupos.

#### b) Técnica inmunohistoquímica

Mediante la inmunohistoquímica, al igual que en la técnica histológica, a través de una valoración subjetiva, se estudió la presencia de PrP<sup>Sc</sup>, mediante una puntuación del cero a tres en las diferentes muestras objeto de estudio, donde cero muestra la inexistencia de proteína priónica en el tejido estudiado y tres la máxima exposición de PrP<sup>Sc</sup> en la muestra. Posteriormente se realizó una comparativa con muestras positivas a Scrapie clásico, con el fin de observar las diferencias presentes en ambos tipos de Scrapie.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Estudio de la evolución clínica

Tras la realización de diferentes pruebas de campo y el estudio de la diversidad de signos clínicos que manifestaron las ovejas inoculadas con Scrapie atípico, se observó que, efectivamente, la sintomatología presente en los animales estaba relacionada con una incoordinación motora y alteración comportamental propia de una afección a nivel cerebelar.

Al tratarse de una enfermedad que afecta al sistema motor y propioceptivo, los primeros síntomas que presentaron las ovejas fueron una pérdida de equilibrio y presencia de movimientos tambaleantes en reposo, lo cual fue detectado a través de unas pruebas de campo en las cuales, se privaba de la visión a las ovejas con una venda y observando su marcha y comportamiento general, ya que es la única manera de recoger los primeros datos al tratarse de una enfermedad que pasa desapercibida en la mayoría de los casos.

Los animales positivos a esta prueba se mostraban vacilantes a la hora de realizar una marcha normal, tendían a desestabilizarse y/o caer al suelo y, además, en algunos animales, se podía observar un apoyo en base amplia para ayudarse a mantener el equilibrio en reposo.

Con una clínica más avanzada, ante esta misma situación, los animales mostraban esta misma sintomatología, pero más acentuada, siendo así, la pérdida de equilibrio y balanceo mucho más evidente en reposo, la inestabilidad en la marcha era mayor y las caídas se producían con facilidad haciendo que, una vez en el suelo, fuera muy difícil que el animal se pusiera de nuevo en pie. Por el contrario, cuando las ovejas no eran privadas de su visión, incluso con la enfermedad avanzada, mostraban un comportamiento y marcha normales, exceptuando una pequeña ataxia en algún animal.

Como se puede observar en la tabla 1, en la cual se muestra la clínica manifestada en los animales, se pudieron observar otros síntomas como son temblores, apatía o nerviosismo pero que, a diferencia de lo que ocurre en Scrapie clásico, la frecuencia de presentación fue mucho menor y no se dio en todas las ovejas. Por último, un signo clínico muy evidente en scrapie clásico y el cual no se vio en ninguno de los animales, fue el prurito y, como consecuencia, el rascado y pérdida de lana en los animales.

**TABLA 1: SINTOMATOLOGÍA EN OVEJAS INOCULADAS INTRACRANEALMENTE CON SCRAPIE ATÍPICO**

		FECHA DE INOCULACIÓN: ABRIL 2013					
OVEJAS E IDENTIFICACIÓN		O-1487	O-1486	O-1482	O-1484	O-1485	O-1483
		C-319	C-309	C-262	C-291	C-293	C-287
		IC-1	IC-2	IC-3	IC-4	IC-5	IC-6
GENOTIPO			AHQ/AHQ	AHQ/AHQ	ARR/AHQ	ARR/AHQ	ARR/AHQ
<b>SINTOMATOLOGÍA</b>	Inestabilidad sin visibilidad		452 dpi	689 dpi	1073 dpi	808 dpi	1073 dpi
	Torneo sin visibilidad		452 dpi		1073 dpi	919 dpi	1073 dpi
	Acunado y postura base amplia sin visibilidad		689 dpi	808 dpi	1073 dpi	919 dpi	1529 dpi
	Intranquilidad, nerviosismo		689 dpi			808 dpi	1073 dpi
	Descoordinación		689 dpi	919 dpi	1529 dpi	1073 dpi	1948 dpi
	Déficit motor, ataxia		808 dpi	808 dpi	1529 dpi	919 dpi	1529 dpi
	Hipometría miembros posteriores y alteración de la marcha		808 dpi	935 dpi	1529 dpi	1765 dpi	1948 dpi
	Torneo			1073 dpi	1529 dpi	1765 dpi	1962 dpi
	Temblor		904 dpi		1948 dpi		
	Apatía			919 dpi	1948 dpi	1129 dpi	
	Adelgazamiento		808 dpi	919 dpi	1948 dpi	1948 dpi	
	Déficit propioceptivo		689 dpi	919 dpi	1192 dpi	1073 dpi	1529 dpi
	Eutanasia	904 dpi	904 dpi	1173 dpi	2114 dpi	2130 dpi	2174 dpi

Nota: dpi = días post inoculación

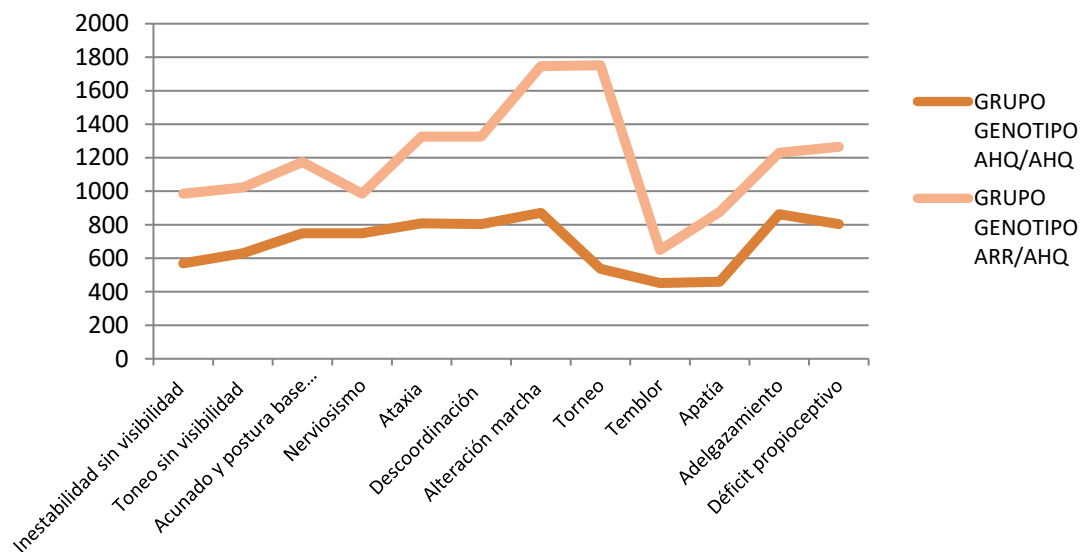
En cuanto al tiempo de presentación de los primeros signos clínicos se observaron periodos que iban desde los 452 días post infección (dpi), en el caso más precoz hasta los 1073 dpi en los casos más tardíos. En este punto es imprescindible hacer una diferenciación de los animales ya que la inoculación se realizó en dos grupos de ovejas diferenciadas genotípicamente (Figura 6):

- Grupo 1. Compuesto por dos ovejas con genotipo AHQ/AHQ, (IC2 e IC3) inoculadas a los seis meses de vida. Originalmente se inocularon tres ovejas, pero una de ellas fue sacrificada por circunstancias ajenas al estudio.
- Grupo 2: compuesto por tres ovejas con genotipo ARR/AHQ (IC4, IC5 e IC6), inoculadas, al igual que el grupo anterior, a los seis meses de vida.



Una vez diferenciados estos grupos, si observamos la gráfica 1, podemos ver que las ovejas pertenecientes al grupo 1 presentaron los primeros signos de la enfermedad a los 570 dpi  $\pm$  118 dpi. En este caso hablamos de la presencia de inestabilidad o torneo cuando los animales estaban privados de visión. En el caso del segundo grupo, estos primeros síntomas se produjeron a los 922 dpi  $\pm$  150 dpi, habiendo una diferencia entre grupos de alrededor de 400 días.

**Fig.6:** Promedio de los días post-inoculación (dpi) a los cuales comenzaron a presentarse los distintos signos clínicos, observados a lo largo del estudio experimental, en los dos genotipos estudiados.



Si observamos la progresión del resto de la clínica, del mismo modo, hay una diferencia muy notoria en el tiempo de aparición del resto de signos clínicos entre ambos grupos, llegando incluso a observarse en aquellos signos que no son comunes a todos los animales, como pueden ser los temblores o apatía, habiendo una diferencia de 940 dpi en la aparición de estos signos entre los dos genotipos.

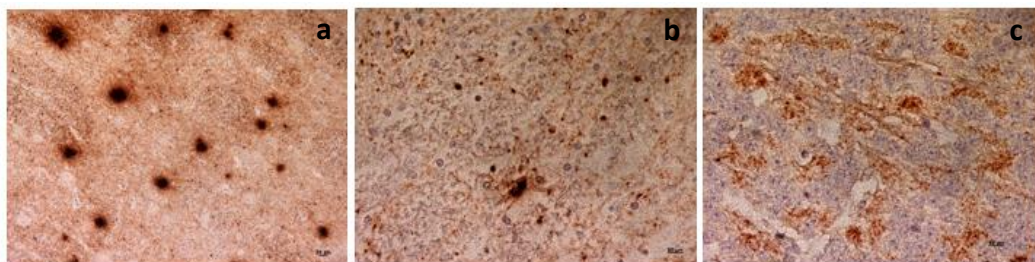
Esta diferencia también está presente en la fecha de eutanasia de los animales, la cual se produjo en el estadio terminal de la enfermedad. En este caso, el grupo de animales AHQ/AHQ, (grupo uno) presentó un estadio final a los 1038 dpi  $\pm$  134 dpi, mientras que en el grupo de animales ARR/AHQ (grupo dos) se produjo a los 2139  $\pm$  25 dpi.

Estos resultados muestran que, efectivamente, aquellos animales con el genotipo AHQ/AHQ parecen presentar una susceptibilidad mayor a presentar la enfermedad que los animales con genotipo ARR/AHQ.

## 5.2. Estudio histopatológico e inmunohistoquímico

El estudio inmunohistoquímico de las muestras procedentes del sistema nervioso central, de las seis ovejas inoculadas, se centró en observar, a través del microscopio, las similitudes y diferencias en cuanto a la propagación y distribución de los depósitos de PrP<sup>Sc</sup> mediante un análisis subjetivo de los distintos cortes (Anexo 1).

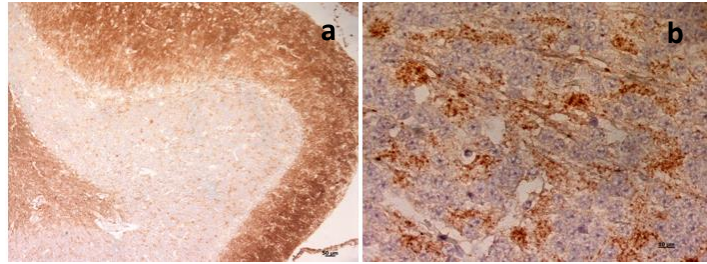
Para la realización de este estudio, de cada oveja se recogieron un total de siete muestras pertenecientes al SNC: medula espinal cervical, óbex, cerebelo, puente del encéfalo, tálamo, ganglios basales y corteza cerebral (Anexo 2), las cuales fueron divididas en diferentes campos correspondientes a las estructuras más importantes de cada sección. En este caso, se evaluó, de forma subjetiva, del cero (ausencia de depósito) a tres (gran presencia de depósito) la distribución y cantidad de depósito observado con el fin de establecer diferencias entre las muestras de los distintos animales. Asimismo, en cada corte se especificó el tipo de depósito observado, diferenciando cuatro grupos observados: depósitos puntiformes (en torno al neuropilo), coalescentes, patrón lineal (depósito asociados a axones neuronales formando líneas más o menos continuas) y depósito en placa (placas amiloides de PrP<sup>Sc</sup>; Kretzschmar, 1993; Richardson et al., 1995). (Figura 7)



**Fig. 7:** Imágenes de distintas áreas del SNC ovino, dónde se pueden observar los distintos tipos de depósito que aparecen en el Scrapie atípico (40x IHQ); a) Depósito en placa y puntiforme a nivel del tálamo (núcleos talámicos); b) Depósito de tipo coalescente y punteado grueso a nivel de ganglios basales; c) Depósito de tipo puntiforme y lineal a nivel del cerebelo.

A nivel general, los depósitos de PrP<sup>Sc</sup> se observaron en todas las muestras recogidas, independientemente del tiempo de exposición de cada animal, pero, a pesar de que la distribución de depósitos se observó a lo largo de todo el SNC, la localización más destacable fue a nivel del cerebelo, tal y como se recogen en otros estudios realizados anteriormente como los realizados por Benestad et al., 2003. En este caso, el corte en el cual se observaba un aumento de depósito puntiforme y lineal fue tanto a nivel de la corteza cerebelar como en las áreas correspondientes a las capas molecular y granular (Figura 8), lo cual sería una zona de depósito

esperada ya que el Scrapie atípico afecta principalmente al sistema motor y propioceptivo, controlado a través del sistema cerebeloso.

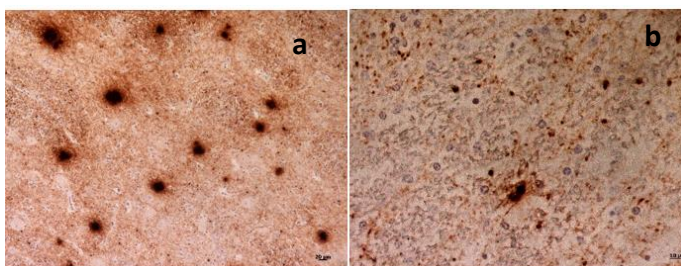


**Fig. 8: Corte histológico de cerebelo de oveja infectada con Scrapie atípico. IHQ;** a) Imagen de corteza cerebelar con gran depósito de PrP<sup>Sc</sup>, de tipo puntiforme (10x); b) Detalle de depósito de tipo puntiforme y lineal en cerebelo (40x).

En este punto cabe destacar que la oveja IC-1 (o-1487), la cual fue eutanasiada de forma precoz debido a causas externas al estudio, y que no presentó ningún signo clínico, también presentaba acumulación de PrP<sup>Sc</sup> principalmente en el área del cerebelo y del tálamo (Tablas 3 y 6), por lo que es probable que la invasión de las áreas “diana” se produzca al inicio de la infección (Benestad et al., 2008, Monleón et al., 2011, Tranulis et al., 2011).

Otra de las áreas en las que se observó una mayor inmunotinción y abundante depósito fue a nivel del diencefalo (Figura 8), del cual se estudiaron dos zonas fundamentales: núcleos talámicos e hipotalámicos. El área que presentaba un nivel mayor de depósito era la correspondiente a los núcleos talámicos, más concretamente a nivel del núcleo ventral del tálamo, en el cual, además de presentar el depósito puntiforme habitual, mostraba depósito de PrP<sup>Sc</sup> en placa, lo que parece ser habitual en animales afectados con scrapie atípico (Wood y Done, 1992; Wood et al., 1997; Jeffrey et al., 1998).

También se pudo observar que a nivel de los ganglios basales (Figura 9) la cantidad de depósito de proteína prion era evidente, principalmente en el área de la capsula interna (sustancia blanca), entre la cual encontramos el núcleo caudado y lenticular, los cuales están íntimamente relacionados con movimiento muscular voluntario.



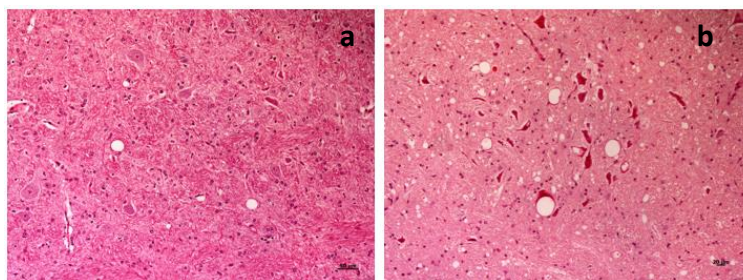
**Fig. 9: Muestras del SNC positivas a Scrapie atípico. IHQ;** a) Imagen a nivel de los núcleos talámicos (tálamo). Depósito de PrP<sup>Sc</sup> puntiforme y en placa (20x); b) Imagen correspondiente a los ganglios basales (cápsula interna). Depósito lineal, puntiforme y coalescente (40x).

Como ya se ha mencionado anteriormente, en el resto de cortes estudiados los resultados obtenidos fueron positivos en mayor o menor medida y predominando de forma generalizada un patrón de depósito de tipo puntiforme, viéndose en algunas zonas agregados de tipo coalescente o lineal pero sin haber una gran diferencia en las distintas muestras tomadas exceptuando alguna zona que presentaba una tinción más intensa, lo cual podría venir dado por la realización de la inoculación, ya que esta técnica no es idéntica en todos los animales.

Por otro lado, a diferencia de lo ocurrido en el estudio clínico, no se observaron diferencias entre grupos de animales en función de su genotipo a nivel laboratorial, en este sentido todos los animales mostraron un patrón similar y homogéneo tanto a nivel de depósito como en la presencia de distintos patrones de depósito y, aunque se pueden observar algunas diferencias entre muestras, no se pudo asociar ni a un genotipo específico ni a la edad del animal.

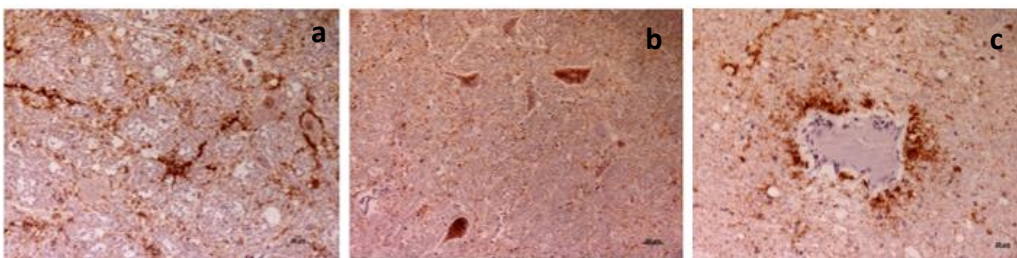
### 5.3. Diferencias IHQ entre Scrapie clásico y Scrapie atípico

Para concluir el trabajo a nivel laboratorial se realizó un estudio comparativo entre Scrapie clásico y Scrapie atípico con el fin de establecer las principales diferencias observables a nivel inmunohistoquímico. Los resultados obtenidos, en el caso del Scrapie clásico, se detallan en la tabla 9. En la enfermedad clásica, una de las lesiones principales observadas en las muestras estudiadas fue la formación de vacuolas y acumulación de PrP<sup>Sc</sup> a nivel de médula espinal, puente del encéfalo, mesencéfalo y tálamo, a diferencia de lo observado en las muestras correspondientes al Scrapie atípico, cuya vacuolización fue prácticamente anecdótica (Figura 10) y la mayor parte de depósito observado fue a nivel cerebelar y talámico, lo cual ya ha sido descrito en diferentes estudios, los cuales hacen referencia a una mayor afección a nivel de la corteza cerebral y cerebelosa (Benestad et al., 2008).

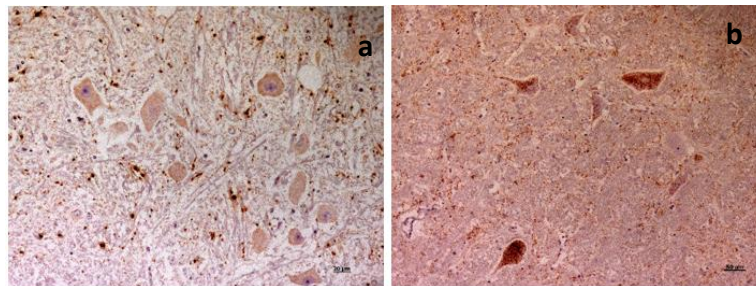


**Fig. 10. Imágenes de dos cortes a nivel del mesencéfalo, positivos a Scrapie atípico y Scrapie clásico. HE;** a) Nivel de vacuolización presente en Scrapie atípico (20x); b) Nivel de vacuolización presente en Scrapie clásico (40x).

Por otro lado, otra de las diferencias observadas entre ambas enfermedades a partir las muestras estudiadas a nivel del SNC, fue la disposición del depósito de PrP<sup>Sc</sup>. En el caso de la enfermedad clásica, pudimos encontrar tipo de depósito intraneuronal, intraglial, estrellado, subpial, perivascular, subependimal, lineal, puntiforme, coalescente, perineuronal y en placa (Figura 11) distribuido en las zonas del SNC mencionadas anteriormente, a diferencia de lo observado en las muestras correspondientes a los animales afectados por scrapie atípico, en las cuales no se observó, en ninguno de los casos, ningún depósito de tipo intraneuronal o intraglial (Figura 12), lo cual estaría en línea con diferentes investigaciones que aseguran que estos hallazgos serían de gran ayuda a la hora de diferenciar la enfermedad clásica de la atípica (Benestad et al, 2003; Buschmann et al., 2004; Moore et al., 2008).



**Fig. 11. Áreas del SNC (ovino) positivas a Scrapie clásico. IHQ;** a) Imagen de corte histológico a nivel del óbex, en la que se puede observar depósito de tipo estrellado (centro de la imagen), así como depósito de tipo perineuronal (derecha de la imagen)(40x); b) Imagen de corte histológico a nivel de óbex, en la que se puede observar depósito de tipo intraneuronal (20x); c) Imagen de corte histológico a nivel de médula, en la que se puede observar depósito de tipo perivascular (40x).



**Fig. 12. Áreas del SNC (ovino) positivas a Scrapie atípico y Scrapie clásico. IHQ;** Imágenes de cortes histológicos a nivel de óbex (núcleos del nervio trigémino) en la que podemos observar una de las principales diferencias que presentan los animales infectados con diferentes tipos de scrapie; a) Detalle de la distribución del prion alrededor de las neuronas (nunca intraneuronal), característica de la infección con Scrapie atípico (40x); b) Invasión intraneuronal propia de la infección con Scrapie clásico (20x).

## 6. CONCLUSIONES

Una vez realizada una búsqueda exhaustiva de material bibliográfico y posterior estudio tanto a nivel clínico como a nivel inmunohistoquímico de las seis ovejas inoculadas experimentalmente podemos exponer las siguientes conclusiones:

- Las manifestaciones clínicas presentes en todas las ovejas estudiadas coinciden con una afección a nivel cerebelar, lo cual se traduce en una alteración a nivel motor y propioceptivo que hace que los animales presenten unos movimientos atáxicos, pendulantes, inestabilidad, caída con dificultad para recuperar la posición inicial y pérdida propioceptiva. En ninguno de los casos se observaron síntomas como fiebre, temblor, prurito o pérdida de la condición corporal evidente, a diferencia de lo que ocurre en la enfermedad clásica.
- Las manifestaciones clínicas de estas ovejas coinciden con las alteraciones observadas a nivel del SNC mediante técnicas inmunohistoquímicas, destacando una mayor afección a nivel cerebelar y talámico.
- Las diferencias observadas entre los dos grupos de ovejas, tanto en el periodo de incubación como en el tiempo de desarrollo de signos clínicos, parecen indicar que los animales con genotipo ARR/AHQ presentan una susceptibilidad menor a la presencia de scrapie atípico respecto a los animales de genotipo AHQ/AHQ.
- Tanto a nivel clínico como a nivel laboratorial las diferencias presentes entre el scrapie clásico y el atípico hace que estas enfermedades se cataloguen como enfermedades distintas, a pesar de que ambas formen parte del grupo de las EET.

## CONCLUSIONS

After an exhaustive search of bibliographic material and subsequent clinical and immunohistochemical studies of the six experimentally inoculated sheep, the following conclusions can be drawn:

- The clinical manifestations present in all the sheep studied coincide with cerebellar involvement, which results in motor and proprioceptive impairment, causing the animals to show ataxic, pendulous movements, instability, falling with difficulty in recovering the initial position and proprioceptive loss. Clinical signs such as fever, tremor, pruritus or loss of body condition were not found in any case, unlike what occurs in the classical disease.
- The differences observed between the two groups of ewes in both the incubation period and the time to develop clinical signs seem to indicate that animals of the ARR/AHQ genotype are less susceptible to develop atypical scrapie than animals of the AHQ/AHQ genotype.
- The clinical manifestations of these sheep coincide with the alterations observed at CNS level by immunohistochemical techniques, highlighting a greater involvement at cerebellar and thalamic level.
- Both at clinical and laboratory level, differences between classical and atypical scrapie mean that these diseases are classified as distinct diseases, despite the fact that both are TSEs.

## 7. VALORACIÓN PERSONAL

La realización de este Trabajo de Fin de Grado me ha dado la oportunidad de conocer un tema, el cual es menos conocido pero con una gran repercusión a nivel científico, sobre todo, gracias a los últimos descubrimientos que se están realizando y que, sin duda, tendrán una gran importancia en el futuro a la hora de conocer el funcionamiento de las EET y avanzar en el estudio de un posible tratamiento de una de las enfermedades más importantes del último siglo, la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB).

Por otro lado, gracias al reto que ha supuesto trabajar sobre un tema del cual no hay demasiada información, he aprendido a mejorar mis capacidades de búsqueda de material bibliográfico, tanto documentación física como diferentes bases de datos científicas, así como me ha ayudado a adquirir más habilidad a la hora de seleccionar y gestionar la información obtenida, lo cual considero esencial en el ejercicio de la profesión veterinaria.

También, gracias a este trabajo, he podido ampliar mis conocimientos tanto en anatomía como en la histología de las diferentes áreas del sistema nervioso central y me ha dado la oportunidad de conocer cómo se comporta esta enfermedad desde el inicio de la infección, tanto a nivel clínico como a nivel laboratorial, lo cual ha sido muy enriquecedor, personal y profesionalmente.

Por último y lo más importante, quisiera agradecer a mis directoras, Belén Marín y Alicia Otero por darme la gran oportunidad de poder realizar este trabajo con ellas y, especialmente, por todo el esfuerzo, dedicación y paciencia que han tenido a lo largo de estos meses, para poder orientarme a la hora de realizar este trabajo. Gracias, porque por el tiempo que he podido pasar con ellas, he podido conocer que, no solo son unas grandes profesionales, sino que son mejores personas.

Y, no quisiera finalizar sin antes, agradecer a todas aquellas grandísimas personas que han estado apoyándome cada día, en especial a mi madre. Sin ellas no habría sido posible llegar hasta aquí.



## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Acín, C., Martín-Burriel, I., Monleón, E., Lyahyai, J., Pitarch, J. L., Serrano C., Monzón M., Zaragoza P., Badiola J. J. (2013). "Prion protein gene variability in Spanish goats. Inference through susceptibility to classical scrapie strains and pathogenic distribution of peripheral PrP<sup>Sc</sup>." *PLoS One*, 8 (4). DOI: 10.1371/journal.pone.0061118
- Arnold, M.E., Rajanayagam, B. (2020). "Will there be any more classical scrapie cases in sheep in Great Britain. A modelling study to predict future cases". *Epidemiology and Infection*, 148, pp. e190. DOI: 10.1017 / S0950268820001855
- Badiola, J. J. (2012). "Las enfermedades priónicas, un modelo de infección paradójica". *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental*, 5, pp. 35-70. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4721514> [Consultado 06-01-2021].
- Badiola, J. J., Pumarola i Battlle, M. (2010). *Encefalopatías Espongiformes Transmisibles*. Barcelona: Ediciones Mayo.
- Badiola, J. J. (2010). "EET en animales. Situación actual y perspectivas. Casos atípicos y tendencia", *Jornadas sobre el control de las EET*. Barcelona, 1 junio 2010. Disponible en: [https://salutweb.gencat.cat/web/.content/\\_ambits-actuacio/Per-perfils/Empreses-i-establiments/ambit-alimentari/documents-tecnics-salut-alimentaria/jornades/1badiola2010.pdf](https://salutweb.gencat.cat/web/.content/_ambits-actuacio/Per-perfils/Empreses-i-establiments/ambit-alimentari/documents-tecnics-salut-alimentaria/jornades/1badiola2010.pdf) [Consultado 23-11-2020].
- Cacace, V. I. (2011). *Biology of Prions*. Tesis doctoral. Universidad de Buenos Aires-Conice. Disponible en: <https://arxiv.org/ftp/arxiv/papers/1106/1106.3533.pdf> [Consultado 29-01-2021].
- Caroline Raksa, H. (2020). *Contribuciones científicas a la influencia que tienen los factores genéticos en la susceptibilidad a las EET en pequeños rumiantes*. Tesis doctoral. Universidad de Zaragoza. Disponible en: <https://zaguan.unizar.es/record/89871/files/TESIS-2020-093.pdf> [Consultado 01-02-2021].

- Cassmann, E. D., Greenlee, J. J. (2020). "Pathogenesis, detection, and control of scrapie in sheep". *American journal of veterinary research*, 81(7), pp. 600-614. DOI: 10.2460 / ajvr.81.7.600
  
- Castilla, J., Gutiérrez Adán, A., Pintado Sanjuanbenito, B., Torres Díaz, J.M., Brun, A. (2002). "Encefalopatías espongiformes transmisibles en especies ganaderas y silvestres (revisión)". *Investigación agraria. Producción y sanidad animales*, 17(1-2), pp. 21-36. Disponible en: [http://www.inia.es/gcontrec/pub/castilla\\_1161097248218.pdf](http://www.inia.es/gcontrec/pub/castilla_1161097248218.pdf) [Consultado 06-11-2020].
  
- Da Silva Barreto, A.C. (2014). *Estudio retrospectivo sobre tremor epizootico em Portugal*. Tesis doctoral. Universidade de Lisboa. Disponible en: <https://www.repository.utl.pt/handle/10400.5/6528> [Consultado 25-01-2021].
  
- De Lourdes Ayala Villegas, F. (2001). *Determinación de la Encefalopatía Espongiforme Ovina (scrapie), mediante histopatología de encéfalos provenientes de mataderos de la región XI de Chile*. Tesis doctoral. Universidad de Chile. Disponible en: <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/130739/DETERMINACION-DE-LA-ENCEFALOPATIA-%20ESPONGIFORME-OVINA%20%28%20SCRAPIE%29%2c-MEDIANTE-HISTOPATOLOGIA-DE-ENCEFALOS-PROVENIENTES-DE-MATADEROS-DE-LA-REGION-XI-DE-CHILE.pdf?sequence=1&isAllowed=y> [Consultado 25-01-2021].
  
- Farías Roldán, G. A. (2013). *Diagnóstico Preclínico de Scrapie mediante Inmunohistoquímica*. Tesis doctoral. Universidad de Córdoba. Disponible en: <https://helvia.uco.es/xmlui/bitstream/handle/10396/10466/769.pdf?sequence=1&isAllowed=y> [Consultado 05-03-2021].
  
- García Crespo, D. (2006). *Desarrollo de métodos moleculares y su aplicación al estudio de la resistencia genética y patogenia molecular del scrapie*. Tesis doctoral. Universidad del País Vasco. Disponible en: <https://www.euskadi.eus/gobierno-vasco/-/libro/desarrollo-de-metodos-moleculares-y-su-aplicacion-al-estudio-de-la-resistencia-genetica-y-patogenia-molecular-del-scrapie/> [Consultado 05-02-2021].
  
- Hoinville, L. J. (1996). "A review of the epidemiology of scrapie in sheep". *Rev Sci Tech*, 15(3), pp. 827-852. DOI: 10.20506 / rst.15.3.959

- Huor, A. et al. (2019). "The emergence of classical BSE from atypical/Nor98 scrapie". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(52), pp. 26853-26862. DOI: 10.1073 / pnas.1915737116
- Loiacono, C. M., Beckwith, N., Kunkle, R. A., Orcutt, D., Hall, S. M. (2010). "Detection of PrP<sup>Sc</sup> in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue by Western blot differentiates classical scrapie, Nor98 scrapie, and bovine spongiform encephalopathy". *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2(5), pp. 1-6. DOI: 10.1177 / 104063871002200502
- Loiacono, C. M., Thomsen, B. V., Mark Hall, S., Kiupel, M., Sutton, D., O'Rourke, K., Barr, B., Anthenill, L., Keane, D. (2009). "Nor98 scrapie identified in the United States". *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 21(4), pp. 1-10. DOI: 10.1177/104063870902100406
- Martín Palomino, P., Gómez Calle, L., Serejo Proença, J., Ruíz Maestre, E., Fernández-García, J.L. (2018). "Genotipado del gen de la proteína priónica en ovejas calificadas de "en peligro de extinción": la oveja merina negra de la península ibérica". *Revista de Biociencias*, 13(2), pp. 1-15. Disponible en: <https://revistas.uax.es/index.php/biociencia/article/view/1251/1024> [Consultado 10-01-21].
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Disponible en: [https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/informe\\_epidemiologicoeets\\_2019\\_definial\\_tcm30-541556.PDF](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/informe_epidemiologicoeets_2019_definial_tcm30-541556.PDF) [Consultado 22-02-21].
- Loiacono, C. M., Beckwith, N., Kunkle, R. A., Orcutt, D., Hall, S. M. (2010). "Detection of PrP<sup>Sc</sup> in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue by Western blot differentiates classical scrapie, Nor98 scrapie, and bovine spongiform encephalopathy". *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2(5), pp. 1-6. DOI: 10.1177 / 104063871002200502
- Otero García, A. (2018). *Estudio de los mecanismos implicados en la barrera de transmisión y en la patogenia de las enfermedades priónicas*. Tesis doctoral. Universidad

- de Zaragoza. Disponible en: <https://zaguan.unizar.es/record/98329/files/TESIS-2021-005.pdf> [Consultado 03-03-2021].
- Pattison, I. H y Millson, G. C. (1961). "Experimental transmission of scrapie to goats and sheep by the oral route". *J Comp Pathol*, 71, pp. 171–176. DOI: 10.1016/S0368-1742(61)80021-0)
  - Prusiner, S. B. (1998). "Prions". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, pp. 13363-13383. DOI: 10.1073 / pnas.95.23.13363
  - Prusiner, S. B., Bolton, D. C., Groth, DF., Bowman, K. A., Cochran, S. P., McKinley, M. P. (1982). "Further purification and characterization of scrapie prions". *Biochemistry*, 21, pp. 6942-6950. DOI: 10.1021 / bi00269a050
  - Rivero Gutiérrez, M. A. (2010). *Análisis integral de la gestión del programa nacional de genotipado ovino en Andalucía*. Trabajo Fin de Master inédito en Zootecnia y Gestión sostenible. Universidad de Córdoba. Disponible en: [http://www.uco.es/zootecniaygestion/img/pictorex/16\\_12\\_06\\_TRABAJO\\_FIN\\_DE\\_MASTER\\_def\[1\].pdf](http://www.uco.es/zootecniaygestion/img/pictorex/16_12_06_TRABAJO_FIN_DE_MASTER_def[1].pdf) [Consultado 17-02-2021].
  - van Keulen, L. J., Vromans, M. E y van Zijderveld, F. G. (2002). "Early and late pathogenesis of natural scrapie infection in sheep". *APMIS*, 110(1), pp. 23-32. DOI: 10.1034 / j.1600-0463.2002.100104.x
  - Wood, J. L et al. (1982-1991). "Neuropathology of scrapie: a study of the distribution patterns of brain lesions in 222 cases of natural scrapie in sheep". *The Veterinary record*, 140(7), pp. 167-74. DOI: 10.1136 / vr.140.7.167

## 9. ANEXOS

### INMUNOHISTOQUÍMICA EN MUESTRAS OVEJAS CON SCRAPIE ATÍPICO

**TABLA 2. RESULTADOS IHQ MÉDULA ESPINAL CERVICAL**

MÉDULA ESPINAL CERVICAL	ASTAS DORSAL Y VENTRAL		SUSTANCIA BLANCA	
	Tipo de depósito y localización	G. I	Tipo de depósito y localización	G. I
Oveja 1482	Punteado fino con predominio en asta dorsal	2.5	Alternancia de depósito globular y fino	1
Oveja 1483	Distribución homogénea de tipo puntiforme fino	0.5	Distribución homogénea de tipo puntiforme fino	1
Oveja 1484	Distribución homogénea de tipo puntiforme fino	0.5	Distribución homogénea de tipo puntiforme fino	1
Oveja 1485	Distribución homogénea de tipo puntiforme fino	0.5	Distribución homogénea de tipo puntiforme fino	1
Oveja 1486	Distribución homogénea de tipo puntiforme fino	1	Muestra positiva con punteado fino	0.5
Oveja 1487	Distribución homogénea de tipo puntiforme fino	1	Mínima exposición (punteado fino)	0-0.5

Nota: G.I: Grado de Inmunotinción

**TABLA 3. RESULTADOS IHQ ÓBEX**

ÓBEX	SUSTANCIA GRIS		SUSTANCIA BLANCA	
	Tipo de depósito y localización	G. I	Tipo de depósito y localización	G. I
Oveja 1482	Punteado fino con aumento a nivel del núcleo motor dorsal del nervio vago	2	Depósito de tipo globular y punteado fino con distribución homogénea	1
Oveja 1483	Distribución homogénea de tipo punteado fino	0.5	Distribución homogénea de tipo punteado fino	1
Oveja 1484	Distribución homogénea de tipo punteado fino	0.5	Distribución homogénea de tipo punteado fino	1
Oveja 1485	Distribución homogénea de tipo punteado fino	0.5	Distribución homogénea de tipo punteado fino	1
Oveja 1486	Distribución homogénea de tipo punteado fino	1	Distribución homogénea de tipo punteado fino	0.5
Oveja 1487	Punteado fino con ligero aumento a nivel del tracto solitario	1	Mínima exposición (punteado fino)	0-0.5

**TABLA 4: RESULTADOS IHQ CEREBELO**

CEREBELO	SUSTANCIA BLANCA		CAPA EXTERNA-MOLECULAR		CAPA GRANULAR	
	Tipo de depósito y localización	G. I	Tipo de depósito y localización	G. I	Tipo de depósito y localización	G. I
Oveja 1482	Distribución homogénea de tipo punteado fino	2.5	Elevada exposición de tipo lineal y punteado fino	3	Distribución homogénea de tipo punteado fino	2.5
Oveja 1483	Distribución homogénea de tipo punteado fino y globular	2.5	Elevada exposición de tipo lineal y punteado fino (capa molecular)	3	Depósito de tipo globular distribuido uniformemente	1.5
Oveja 1484	Elevada exposición de tipo punteado fino	3	Elevada exposición de tipo punteado fino y globular (capa externa)	3	Distribución homogénea de tipo punteado fino y globular	2-2.5
Oveja 1485	Elevada exposición de tipo punteado fino	2.5	Distribución homogénea de tipo punteado fino (capa externa)	3	Distribución homogénea de tipo punteado fino	1.5
Oveja 1486	Distribución homogénea de tipo punteado fino	2	Elevada exposición de tipo punteado fino (capa externa)	2.5-3	Elevada exposición de tipo punteado fino y globular	3
Oveja 1487	Mínima exposición (punteado fino)	0.5	Distribución homogénea de tipo punteado fino (capa molecular)	1.5	Distribución homogénea de tipo punteado fino y formación coalescente	2-2.5

**TABLA 5. RESULTADOS IHQ PUENTE DEL ENCÉFALO**

PUENTE DEL ENCÉFALO	SUSTANCIA GRIS		SUSTANCIA BLANCA	
	Tipo de depósito y localización	G. I	Tipo de depósito y localización	G. I
Oveja 1482	Distribución homogénea de tipo punteado fino (Núcleos vestibulares)	2	Elevada exposición de tipo puntiforme a nivel de formación reticular y en deep cerebelar	2.5-3
Oveja 1483	Distribución homogénea de tipo punteado fino	1.5-2	Distribución punteado fino en formación reticular y deep cerebelar	2
Oveja 1484	Distribución homogénea de tipo punteado fino (Núcleos vestibulares)	1	Elevada exposición de tipo puntiforme a nivel de formación reticular y en deep cerebelar	2.5
Oveja 1485	Distribución homogénea de tipo punteado fino (Núcleos vestibulares)	1	Distribución homogénea de tipo punteado fino ligeramente a nivel de la formación reticular y en deep cerebelar	1.5
Oveja 1486	Distribución homogénea de tipo punteado fino (Núcleos vestibulares)	1	Distribución homogénea de tipo punteado fino ligeramente a nivel de la formación reticular y en deep cerebelar	1.5-2
Oveja 1487	Mínima exposición (punteado fino)	0-0.5	Mínima exposición (punteado fino)	0-0.5

**TABLA 6. RESULTADOS IHQ MESENCÉFALO**

MESENCÉFALO	SUSTANCIA GRIS Y SUSTANCIA BLANCA	
	Tipo de depósito y localización	G. I
Oveja 1482	No se puede valorar la muestra	-
Oveja 1483	Distribución homogénea de tipo puntiforme (núcleo geniculado, núcleo rojo y oculomotor (cercano al epéndimo))	1-1.5
Oveja 1484	Distribución homogénea de tipo puntiforme llegando a coalescente en sustancia blanca. Patrón lineal en crus cerebri	1.5-2.5
Oveja 1485	Mínima exposición (punteado fino)	0-0.5
Oveja 1486	Distribución homogénea de tipo puntiforme a nivel del folículo superior y crus cerebri. Mínima exposición en el resto	0.5-2
Oveja 1487	Distribución homogénea de tipo puntiforme a nivel de crus cerebri. Mínima exposición en el resto	0.5-1.5

**TABLA 7. RESULTADOS IHQ TÁLAMO**

TÁLAMO	NÚCLEOS TALÁMICOS		NÚCLEOS HIPOTALÁMICOS	
	Tipo de depósito y localización	G. I	Tipo de depósito y localización	G. I
Oveja 1482	Elevada exposición de tipo puntiforme y confluyente	2.5-3	Distribución homogénea de tipo puntiforme	1
Oveja 1483	Distribución homogénea de tipo puntiforme y en placa	2	No hay información de este corte	-
Oveja 1484	Elevada exposición de tipo puntiforme y confluyente (núcleo ventral del tálamo)	3	Mínima exposición (punteado fino)	0.5
Oveja 1485	Distribución homogénea de tipo puntiforme y en placa	1.5	Mínima exposición (punteado fino)	0.5
Oveja 1486	Elevada exposición de tipo punteado fino y en placa	2.5-3	Distribución homogénea de tipo puntiforme y confluyente	1.5
Oveja 1487	Distribución homogénea de tipo puntiforme	2	Mínima exposición (punteado fino)	0.5

**TABLA 8. RESULTADOS IHQ GÁNGLIOS BASALES**

GANGLIOS BASALES	NÚCLEOS BASALES		SUSTANCIA GRIS CORTEZA CEREBRAL		SUSTANCIA BLANCA CORTEZA CEREBRAL	
	Tipo de depósito y localización	G. I	Tipo de depósito y localización	G. I	Tipo de depósito y localización	G. I
Oveja 1482	Distribución homogénea de tipo punteado fino (núcleo lenticular y cápsula interna)	1-2	Distribución homogénea de tipo punteado fino	1.5	Distribución homogénea de tipo punteado fino y globular	2
Oveja 1483	Distribución homogénea de tipo punteado fino y globular (núcleo septal y cápsula interna)	2.5	Mínima exposición (punteado fino)	0.5	Distribución homogénea de tipo punteado fino y globular	1.5
Oveja 1484	Elevada exposición de tipo punteado fino y coalescente (cápsula interna y núcleo caudado), positivo en el resto	0.5-3	Distribución homogénea de tipo punteado fino	1.5	Distribución homogénea de tipo punteado fino	1.5
Oveja 1485	Distribución homogénea de tipo punteado fino y globular (núcleo septal y cápsula interna)	1.5-2	Distribución homogénea de tipo punteado fino	1.5	Distribución homogénea de tipo punteado fino	1.5
Oveja 1486	Distribución homogénea de tipo punteado fino (cápsula interna y núcleo caudado)	2	Distribución homogénea de tipo punteado fino	1.5	Distribución homogénea de tipo punteado fino y globular	1.5-2
Oveja 1487	Mínima exposición (punteado fino)	0.5-1	Distribución homogénea de tipo punteado fino	1.5	Distribución homogénea de tipo punteado fino	1.5



**TABLA 9. HISTOQUÍMICA EN MUESTRA DE OVEJA CON SCRAPIE CLÁSICO**

<b>MÉDULA ESPINAL</b>		
	<b>Tipo de depósito y localización</b>	<b>G. I</b>
<b>Astas dorsal y ventral</b>	Distribución homogénea de tipo punteado fino	3
<b>Sustancia blanca</b>	Distribución homogénea de tipo punteado fino	1.5
<b>ÓBEX</b>		
	<b>Tipo de depósito y localización</b>	<b>G. I</b>
<b>Muestra general</b>	Distribución homogénea de tipo granular y coalescente (perineuronal e intraneuronal) tanto a nivel del núcleo dorsal motor del nervio vago como a nivel del nervio cuneiforme y trigémino. Disminución a nivel del nervio hipogloso y núcleo de la oliva, observándose depósito de tipo lineal y puntiforme (perivacuolar)	1-2.5
<b>MESENCÉFALO</b>		
	<b>Tipo de depósito y localización</b>	<b>G. I</b>
<b>Colículo superior</b>	Depósitos en forma estrellada y perivascular. Marcado el depósito perineuronal	2
<b>Sustancia blanca</b>	Depósito de tipo estrellado e intraneuronal abundante	2.5
<b>PUENTE DEL ENCÉFALO</b>		
	<b>Tipo de depósito y localización</b>	<b>G. I</b>
<b>Sustancia blanca</b>	Distribución homogénea de tipo granular, coalescente (perineuronal e intraneuronal) y lineal	2.5-3
<b>Núcleo vestibular</b>	Depósito de tipo estrellado e intraneuronal muy abundante	2.5-3
<b>Deep cerebelar</b>	Distribución de tipo lineal y de tipo puntiforme (perivacuolar, perineuronales e intraneuronales)	1.5
<b>CEREBELO</b>		
	<b>Tipo de depósito y localización</b>	<b>G. I</b>
<b>Sustancia gris</b>	Depósitos de tipo estrellado y subpial (bajo piamadre). Distribución homogénea de tipo punteado fino	1
<b>Sustancia blanca</b>	Distribución homogénea de tipo punteado fino	1
<b>GANGLIOS BASALES</b>		
	<b>Tipo de depósito y localización</b>	<b>G. I</b>
<b>Núcleos basales, caudales y lenticulares</b>	Acúmulo de placas dispersas junto a depósito perineuronal	1.5
<b>Cápsula interna</b>	Baja exposición con presencia de algún depósito de tipo perivascular	0.5
<b>TÁLAMO</b>		
	<b>Tipo de depósito y localización</b>	<b>G. I</b>
<b>Núcleos talámicos</b>	Distribución homogénea de tipo granular y puntiforme	2
<b>Núcleo ventral del tálamo</b>	Distribución homogénea de tipo puntiforme (perineuronal e intraneuronal). Depósito de placa aislada	2
<b>Hipotálamo</b>	Depósito perineuronal y lineal. Algún depósito de tipo estrellado	2
<b>CORTEZA FRONTAL</b>		
	<b>Tipo de depósito y localización</b>	<b>G. I</b>
<b>Muestra general</b>	Depósito de tipo subpiar (bajo piamadre) y de tipo puntiforme	1

## ANEXO 2. IMÁGENES A NIVEL MICROSCÓPICO DE LAS AREAS DEL SNC ESTUDIADAS

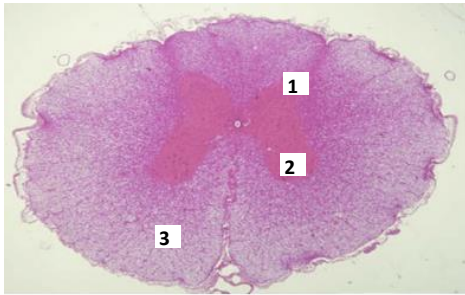


Imagen de **Médula espinal cervical**: 1. Asta dorsal; 2. Asta ventral; 3. Sustancia blanca

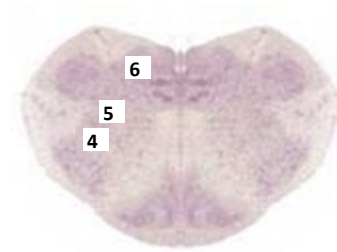


Imagen de **Óbex**: 4. Tracto espinal del nervio del trigémino; 5. Tracto solitario; 6. Núcleo motor dorsal del nervio vago



Imagen de **Cerebelo**: 7. Capa molecular; 8. Capa granular; 9. Sustancia blanca

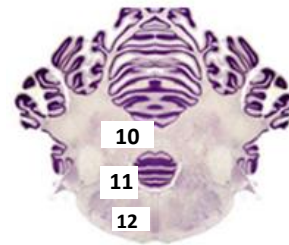


Imagen de **Puente del encéfalo**: 10. Núcleos vestibulares (lateral, espinal y medial); 11. Deep cerebelar (núcleos cerebelares lateral, intermedio y medial); 12. Formación reticular

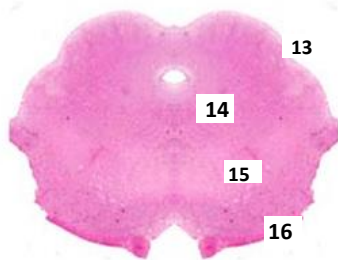


Imagen de **Mesencéfalo**: 13. Núcleos geniculados, 14. Núcleo oculomotor, 15. Núcleo rojo, 16. Crus cerebri

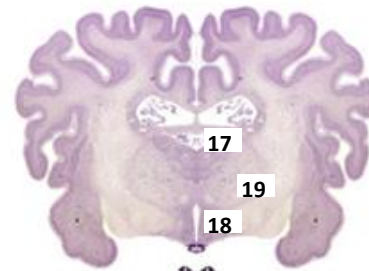


Imagen de **Tálamo**: 17. Núcleos talámicos (paraventricular, paratenial, anterodorsal, anteroventral, anteromedial, romboide, reticular); 18. Núcleos hipotalámicos (periventricular, ventromedial, arcuate); 19. Núcleo ventral del tálamo



Imagen de **Mesencéfalo**: 19. Núcleo septal; 20. Núcleo caudado, 21. Cápsula interna; 22. Núcleo lenticular; 23. Sustancia gris de la corteza cerebral; 25. Sustancia blanca de la corteza cerebral.